

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-113851
(43)Date of publication of application : 26.04.1994

(51)Int.Cl. C12N 15/11
C12Q 1/68
G01N 33/48

(21)Application number : 04-271761 (71)Applicant : SUMITOMO CHEM CO LTD
(22)Date of filing : 09.10.1992 (72)Inventor : YAMAMOTO TOSHIYA
NISHIKAWA AKIRA

(54) METHOD FOR DISTINGUISHING VARIETY OF RICE PLANT USING
OLIGONUCLEOTIDE

(57)Abstract:

PURPOSE: To simply distinguish varieties of rice plant by amplifying genome DNA by using a specific oligonucleotide as a primer and subjecting the oligonucleotide to polymerase chain reaction.

CONSTITUTION: An oligonucleotide having a sequence 5'- GGAGACATCATCGAATCAGA-3' or 5'-TCCCTCCAGGGCTCAAAGTC-3' is used as a primer and subjected to polymerase chain reaction to amplify genome DNA of vegetable of rice plant (*Oryza sativa L.*). The amplified genome DNA is separated by electrophoresis and the amplified genome DNA is visually detected by dyeing method, etc.

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) **公開特許公報 (A)**

(11)特許出願公開番号

特開平6-113851

(43)公開日 平成6年(1994)4月26日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/11				
C 1 2 Q 1/68	Z NA Z	7823-4B		
G 0 1 N 33/48		7055-2J		
		8931-4B	C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数2(全 8 頁)

(21)出願番号	特願平4-271761	(71)出願人	000002093 住友化学工業株式会社 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号
(22)出願日	平成4年(1992)10月9日	(72)発明者	山本 俊哉 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化 学工業株式会社内
		(72)発明者	西川 晶 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化 学工業株式会社内
		(74)代理人	弁理士 久保山 隆 (外1名)

(54)【発明の名称】 オリゴヌクレオチドを用いるイネ品種の識別方法

(57)【要約】

【構成】 下記の配列群から選ばれる配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて、ポリメラーゼチェイン反応によりイネ (*Oryza sativa* L.) 植物のゲノムDNAを増幅し、該増幅ゲノムDNAを電気泳動にて分離後、増幅ゲノムDNAの視覚検出を行なうこととを特徴とするイネ (*Oryza sativa* L.) 品種の識別方法。

sativa L.) 品種をより簡便にかつ効率よく識別する効果を有する。

配列群

- (1) 5' - GGAGACATCATCGAACATCAGA -
3' ,
- (2) 5' - TCCCTTCCAGGGCTCAAGTC -
3' ,
- (3) 5' - TGGTAGCTCTTGTATTGGAG -
3' ,
- (4) 5' - TCTAACATTTAGATGCAAG -
3'

【効果】 本発明方法は、本発明方法で用いられるオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて、ポリメラーゼチェイン反応を利用することにより、イネ (*Oryza*

【特許請求の範囲】

【請求項1】下記の配列群から選ばれる配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて、ポリメラーゼチエイン反応によりイネ (*Oryza sativa* L.) 植物のゲノムDNAを増幅し、該増幅ゲノムDNAを電気泳動にて分離後、増幅ゲノムDNAの視覚検出を行なうことを特徴とするイネ (*Oryza sativa* L.) 品種の識別方法。

配列群

- (1) 5'-GGAGACATCATCGAATCAGA-3'
- (2) 5'-TCCCTTCCAGGGCTCAAGTC-3'
- (3) 5'-TGGTAGCTCTTGTATTGGAG-3'
- (4) 5'-TCTAACATTTAGATGCAAG-3'

【請求項2】下記の配列群から選ばれる配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる請求項1記載のイネ (*Oryza sativa* L.) 品種の識別方法。

配列群

- (1) 5'-GGAGACATCATCGAATCAGA-3' および 5'-TCCCTTCCAGGGCTCAAGTC-3'
- (2) 5'-TGGTAGCTCTTGTATTGGAG-3' および 5'-TCTAACATTTAGATGCAA G-3'

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、オリゴヌクレオチドを用いるイネ (*Oryza sativa* L.) 品種の識別方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】従来、イネ (*Oryza sativa* L.) 品種の識別方法として、たとえば草丈、穂の形や大きさ、粉の形や大きさ、玄米の形や大きさ、葉の形等の形態の差異による方法、穂、粉、玄米、葉等の色の差異による方法、出穂期、耐冷性、病虫害抵抗性、日長に対する反応等の生理的特徴の差異による方法、アイソザイム、貯蔵タンパク質等のタンパク質レベルの差異による方法が知られている。一方、最近では、RFLP法 (Restriction Fragment Length Polymorphism) によるイネ (*Oryza sativa* L.) 品種の識別方法が、たとえば Z. Y. Wang and S. D. Tanksley, GENOME, 第32巻、第1113頁から第1118頁 (1989年) 等に記載されている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、形態、色、生理的特徴の差異による方法では、実際に前記の形質について調査可能になるまで栽培し、その品種の特徴を調査するしかなかった。このため、大規模な栽培施設

や労力が要求され、栽培期間に相当する時間がかかることになる。また、タンパク質レベルの差異による方法では、品種を識別するのに十分な差異が得られにくく、また経験や労力を要する。一方、RFLP法による識別方法では、ゲノムDNAの制限酵素処理、サザンプロットハイブリダイゼーション (標識DNAプローブとのハイブリッド形成) 等に非常に労力がかかる。したがって、イネ (*Oryza sativa* L.) 品種のより簡便なかつ効率よい識別方法の開発が待ち望まれていた。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の状況を鑑み、よりすぐれたイネ (*Oryza sativa* L.) 品種の識別方法を見出すべく鋭意検討を重ねた結果、ある特定の配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて、ポリメラーゼチエイン反応を利用することにより、イネ (*Oryza sativa* L.) 品種のより簡便なかつ効率よい識別方法を見い出し、本発明を完成した。すなわち、本発明は、下記の配列群から選ばれる配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて、ポリメラーゼチエイン反応によりイネ (*Oryza sativa* L.) 植物のゲノムDNAを増幅し、該増幅ゲノムDNAを電気泳動にて分離後、増幅ゲノムDNAの視覚検出を行なうことを特徴とするイネ (*Oryza sativa* L.) 品種の識別方法 (以下、本発明方法と記す。)

配列群

- (1) 5'-GGAGACATCATCGAATCAGA-3' (以下、配列番号1と記す。)
- (2) 5'-TCCCTTCCAGGGCTCAAGTC-3' (以下、配列番号2と記す。)
- (3) 5'-TGGTAGCTCTTGTATTGGAG-3' (以下、配列番号3と記す。)
- (4) 5'-TCTAACATTTAGATGCAAG-3' (以下、配列番号4と記す。)

を提出するものである。好ましくは下記の配列群から選ばれる配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いるイネ (*Oryza sativa* L.) 品種の識別方法等をあげることができる。

配列群

- (1) 5'-GGAGACATCATCGAATCAGA-3' および 5'-TCCCTTCCAGGGCTCAAGTC-3'
- (2) 5'-TGGTAGCTCTTGTATTGGAG-3' および 5'-TCTAACATTTAGATGCAA G-3'

【0005】本発明方法は、たとえば、品種の純度検定、保存中における変異株のチェック、係争裁定および親子鑑定 (F1植物検定を含む) 等においてきわめて有用である。すなわち、対象植物を充分成長するまでの長期間栽培して所期の品種であるか否かを検定する手間を省略して、前記の対象植物の種子、幼植物等の段階で直

ちに所期の品種であるか否かの検定を行なうことが可能であり、これは品種の純度検査において検査の迅速・簡素化、保存中における変異株のチェックにおいて原原種生産・遺伝種子資源の保存状態の検査の迅速・簡素化、登録品種の権利侵害があった場合の係争裁判において栽培環境等で変化しない等の高度な証拠の提出の迅速化および親子鑑定（F1植物検定を含む）において品種改良の効率化、F1種子生産での品質管理の低コスト化になる。

【0006】本発明方法においてイネ（*Oryza sativa* L.）植物のゲノムDNAは、たとえば最新農学実験の基礎、東北大学農学部農学科編、1990 東京・（株）ソフトサイエンス社発行および生物化学実験のてびき 3 核酸の分離・分析法 泉美治ら共編 1986年京都。

（株）化学同人等に記載される通常のDNA抽出方法によって行なうことができる。具体的には、たとえば、供試植物の緑葉等の組織を液体窒素中で磨碎する（種子を用いる場合は、たとえば種皮を除いた後の組織を用いることが望ましい。）。該磨碎物に臭化セチルトリメチルアンモニウム（CTAB）溶液を添加して、インキュベート後、クロロホルム-イソアミルアルコールを加えてよく混和する。遠心分離により水層を分離・回収し、これにイソプロピルアルコールを加えて混和する。遠心分離により沈澱部を回収後、たとえばEDTA等含有の緩衝液を加えて溶解し、RNase処理する。処理後、フェノール、フェノールとクロロホルム-イソアミルアルコール、クロロホルム-イソアミルアルコールの順序で溶媒を置換する。置換処理後、エタノールを加えてよく混和し、遠心分離によりゲノムDNAを得る方法をあげることができる。

【0007】本発明方法で用いられるオリゴヌクレオチドは、たとえばβ-シアノエチルホスホアミダイト法やチオホスファイト法を用いる市販の自動DNA合成装置によって得ることができる。

【0008】本発明においてイネ（*Oryza sativa* L.）植物のゲノムDNAの増幅は、本発明方法で用いられるオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて、ポリメラーゼチエイン反応により行なう。ポリメラーゼチエイン反応は、変性工程、プライマーのアニーリング工程およびDNAポリメラーゼによる伸長工程からなるDNA複製サイクルを繰り返して行なう反応であり、たとえばSaikiら、Science、第230巻、第1350頁から第1354頁（1985年）やWilliamsら、Nucleic Acids Research、第18巻、第22号、第6531頁から第6535頁（1991年）等に通常の方法が記載されている。

【0009】本発明において上記ポリメラーゼチエイン反応として、たとえば、あらかじめ本発明オリゴヌクレオチド、DNAポリメラーゼ、4種類の塩基（dATP、dTTP、dCTP、dGTP）およびイネ（*Oryza sativa* L.）植物のゲノムDNAを加えた約1.0mMから約4.0mM、好ま

しくは約1.5mMから約3.0mMの塩化マグネシウム等を含有する増殖用緩衝液中で、約20回から約50回、好ましくは約25回から約40回DNA複製サイクルを繰り返して行なうことをあげることができる。さらに、ポリメラーゼチエイン反応における各工程は、たとえば下記の条件等で行なうことができる。変性工程は、たとえば、通常約90°Cから約95°C、好ましくは約94°Cから約95°Cで、約1分間から約3分間、好ましくは約1分間から約2分間加熱することにより行なう。プライマーのアニーリング工程は、たとえば、通常約30°Cから約60°Cで、好ましくは約37°Cから約50°Cで、約1分間から約3分間、好ましくは約1分間から約2分間プライマーとインキュベートすることにより行なう。プライマーは本発明オリゴヌクレオチドを単独で用いる、または併用することができる。DNAポリメラーゼによる伸長工程は、たとえば、通常約70°Cから約73°C、好ましくは約72°Cから約73°Cで、約1分間から約4分間、好ましくは約2分間から約3分間耐熱性DNAポリメラーゼ処理すること等により行なう。耐熱性DNAポリメラーゼとしては、たとえば、宝酒造株式会社製の耐熱性DNAポリメラーゼ等の市販のものをあげることができる。

【0010】上記方法により得られた増幅ゲノムDNAは、通常DNAの分離に用いられる電気泳動法によって分離される。一般には、1000塩基対以下の短かいDNA断片の分離では、約3%から約20%のポリアクリルアミドゲルが、また、それ以上に長いDNAの分離では約0.2%から約2%のアガロースゲルをあげることができる。好ましくは、約1%から約2%のアガロースゲルが適している。電気泳動に用いられる緩衝液としては、Tris-リン酸系（pH7.5-8.0）、Tris-酢酸系（pH7.5-8.0）、Tris-ホウ酸系（pH7.5-8.3）等があげられ、好ましくはTris-酢酸系をあげることができる。また必要に応じて、EDTA等を添加することもできる。電気泳動の条件としては、たとえば、100V、40分間および50V、80分間等をあげることができる。サイズマーカーとしては、ラムダDNAを制限酵素Hind IIIによって完全加水分解したもの、たとえば、宝酒造株式会社製の市販のものを用いることができる。

【0011】本発明方法において増幅ゲノムDNAの視覚検出としては、たとえば、エチジウムプロミド等のフェナントリジン系の色素で、かつ核酸と相互作用するような物質を用いる染色法によって、DNAを検出する方法をあげることができる。該染色法は、あらかじめ電気泳動に用いられる緩衝液に、たとえば、終濃度として約0.5μg/mlのエチジウムプロミド等の物質を加えておくと、暗所で254nmまたは366nm等の紫外線をゲルに照射することによって、電気泳動中でも、DNAとエチジウムプロミドの結合体の赤色バンドを検出できるが、通常、電気泳動終了後に、ゲルをエチジウムプロミド等

の物質の溶液に約15分間から約60分間浸してから暗所で254nmまたは366nm等の紫外線をゲルに照射することによって、DNAとエチジウムブロミドの結合体の赤色バンドを検出する。結果、検出された增幅ゲノムDNAの存在有無によってイネ (*Oryza sativa* L.) 品種を区別することが可能となる。必要に応じて電気泳動によって分離された各種サイズ(分子量)の増幅ゲノムDNAの存在有無を組み合せることによってもイネ (*Oryza sativa* L.) 品種を識別することができる。さらに、プライマーとして本発明で用いられるオリゴヌクレオチドを各種の組み合せにより併用すれば、より詳細で、正確な品種間の識別を可能にする。また、同定の精度または品種間の識別能力をさらに高める場合、プライマーのアニーリング工程の温度、反応用緩衝液中のマグネシウム濃度等のポリメラーゼチエイン反応の条件を変化させて同一な挙動を示すか否かを調べることにより可能である。

【0012】

【実施例】以下、実施例についてさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例になんら限定されるものではない。

【0013】実施例1 (ゲノムDNAの抽出)

イネ (*Oryza sativa* L.) 品種として、黄金晴(ジャポニカ、以下、品種番号1と記す。)、アケノホシ(ジャポニカ、以下、品種番号2と記す。)、コシヒカリ(ジャポニカ、以下、品種番号3と記す。)、日本晴(ジャポニカ、以下、品種番号4と記す。)、関東138号(ジャポニカ、以下、品種番号5と記す。)、オオチカラ(ジャポニカ、以下、品種番号6と記す。)、トヨハタモチ(ジャポニカ、以下、品種番号7と記す。)、S201(ジャポニカ、以下、品種番号8と記す。)、Calrose 76(ジャポニカ、以下、品種番号9と記す。)、天摩(ジャポニカ、以下、品種番号10と記す。)、科晴3号(ジャポニカ、以下、品種番号11と記す。)、雲穂21号(ジャポニカ、以下、品種番号12と記す。)、台中65号(ジャポニカ、以下、品種番号13と記す。)、Bahia(ジャポニカ、以下、品種番号14と記す。)、Lido(ジャポニカ、以下、品種番号15と記す。)、IRAT 13(ジャヴァニカ、以下、品種番号16と記す。)、Dubovsky 129(インディカ、以下、品種番号17と記す。)、トヨニシキ(ジャポニカ、以下、品種番号18と記す。)、Lokt-jan(ジャヴァニカ、以下、品種番号19と記す。)、IR36(インディカ、以下、品種番号20と記す。)、青二矮(インディカ、以下、品種番号21と記す。)、紅陽矮(インディカ、以下、品種番号22と記す。)、密陽23号(インディカ、以下、品種番号23と記す。)、Krishna(インディカ、以下、品種番号24と記す。)、Mahsuri(インディカ、以下、品種番号25と記す。)、RD3(インディカ、以下、品種番号26と記す。)、台中来1

号(インディカ、以下、品種番号27と記す。)、Chinsurah Boro 11(インディカ、以下、品種番号28と記す。)、BG367-4(インディカ、以下、品種番号29と記す。)、L201(ジャヴァニカ、以下、品種番号30と記す。)、Kartuna(ジャヴァニカ、以下、品種番号31と記す。)、Mudgo(インディカ、以下、品種番号32と記す。)、Saji(ジャヴァニカ、以下、品種番号33と記す。)、むさしこがね(ジャボニカ、以下、品種番号34と記す。)を用いた。上記のイネ (*Oryza sativa* L.) 植物の各種品種の綠葉組織(生重量3g)を細かく切り刻んで、該組織片を約100mlの液体窒素中に1分間浸し、凍結させた。該凍結物を乳鉢と乳棒を用いて、液体窒素中で粉末状にした後、液体窒素を気化させた。得られた粉末をあらかじめ60°Cに保温しておいた10mlの2% (w/v) CTA溶液に入れ、よく混合した。60°Cで、30分間インキュベート後、さらに等量のクロロホルム-イソアミルアルコール(クロロホルム:イソアミルアルコール=24:1)を加え、15分間振とう混合した。該混合物を遠心分離(1940g, 15分間)して得られる水層を回収して、これに0.7倍量のイソプロピルアルコールを加え、振とう混合した。該混合物を遠心分離(1940g, 15分間)して得られる沈殿を回収した。5分間風乾させた後、これに1mlの1mM EDTAを含有する20mM Tris-塩酸緩衝液(pH 7.5)を加え、懸濁した。沈殿が完全に溶解した後、2.5ユニットのRNase(ベーリンガーマンハイム社製)を加え、37°Cで、45分間インキュベートした。さらに1mlのフェノールを加え、10分間振とうした。そして遠心分離(1940g, 10分間)によって得られた水層を回収後、これに0.5mlのフェノールと1mlのクロロホルム-イソアミルアルコール(クロロホルム:イソアミルアルコール=24:1)を加え、10分間振とうした。これを遠心分離(1940g, 5分間)して得られた水層を回収し、次に1mlのクロロホルム-イソアミルアルコール(クロロホルム:イソアミルアルコール=24:1)を加え、数回振とう混合した。これを遠心分離(1940g, 5分間)して得られた水層を回収し、次に0.1mlの3M酢酸ナトリウムおよび2.5mlのエタノールを加え、10分間振とうした。遠心分離(1940g, 10分間)によって得られた沈殿を回収後、該沈殿に1mlの70%のエタノールを加え、洗浄した。60分間風乾によりエタノールを除去して、イネ (*Oryza sativa* L.) 植物の各種品種のゲノムDNAを約100μg得た。

【0014】実施例2

あらかじめプライマーとして20ピコモルの配列番号1および配列番号2で示される配列からなる本発明方法で用いられるオリゴヌクレオチド(宝酒造株式会社製委託合成物)、2.5ユニットの耐熱性DNAポリメラーゼ(宝酒造株式会社製)1.0ナノモルの4種の各々塩基

(dATP、dTTP、dCTP、dGTP) および 0.1 μg の実施例 1 で得られた各種のイネ (*Oryza sativa* L.) 品種のゲノム DNA を加えた 0.01% ゲラチン、5.0 mM の塩化カリウム、3.0 mM の塩化マグネシウムを含有する 1.0 mM の Tris-塩酸緩衝液 (pH 8.3) 中で、ポリメラーゼチエイン反応を行なった。反応液量は 20 μl とし、反応液の蒸発を防ぐために約 20 μl のミネラルオイルを添加した。上記のポリメラーゼチエイン反応における各工程は下記の条件で行なった。変性工程は 94 °C で、5 分間加熱し、プライマーのアニーリング工程は 40 °C で、2 分間プライマーとインキュベートし、DNA ポリメラーゼによる伸長工程は 72 °C で、3 分間耐熱性 DNA ポリメラーゼ処理する第 1 サイクルを 1 回行なった後、変性工程は 94 °C で、1 分間加熱し、プライマーのアニーリング工程は 40 °C で、2 分間プライマーとインキュベートし、DNA ポリメラーゼによる伸長工程は 72 °C で、3 分間耐熱性 DNA ポリメラーゼ処理する第 2 サイクルを 40 回行ない、さらに変性工程は 94 °C で、1 分間加熱

し、プライマーのアニーリング工程は 40 °C で、2 分間プライマーとインキュベートし、DNA ポリメラーゼによる伸長工程は 72 °C で、10 分間耐熱性 DNA ポリメラーゼ処理する第 3 サイクルを 1 回行なう。得られた增幅ゲノム DNA は、1.5% アガロースゲルを用いて、1 mM EDTA を含有する 4.0 mM Tris-2.0 mM 酢酸緩衝液 (pH 8.0) 中で、50 V、80 分間電気泳動して分離した。その際にサイズマークーとして、宝酒造株式会社製の pH Y DNA マーカーを用いた。分離終了後、ゲルを 0.5 μg/ml のエチジウムプロミド水溶液に 30 分間浸漬してから暗所で 254 nm の紫外線をゲルに照射することによって、DNA とエチジウムプロミドの結合体の赤色バンドを検出した。結果を表 1～3 に示した。約 1070、約 980 bp の增幅ゲノム DNA が検出され、33 品種のイネ (*Oryza sativa* L.) 植物を 4 タイプに識別することができた。

【0015】

【表 1】

品種番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
増幅ゲノム DNA 1070bp	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
増幅ゲノム DNA 980bp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
品種タイプ	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B

【0016】

【表 2】

品種番号	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
増幅ゲノム DNA 1070bp	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
増幅ゲノム DNA 980bp	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
品種タイプ	D	B	B	D	B	A	B	B	A	A	A

【0017】

【表 3】

品種番号	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
増幅ゲノム DNA 1070bp	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
増幅ゲノム DNA 980bp	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
品種タイプ	A	A	A	A	A	C	A	A	B	A	B

* + : 増幅ゲノム DNA が検出された。

- : 増幅ゲノム DNA を検出できなかった。

【0018】実施例 3

配列番号 1 および配列番号 2 で示される配列からなる本発明方法で用いられるオリゴヌクレオチドのかわりに、配列番号 3 および配列番号 4 で示される配列からなるオ

リゴヌクレオチドを用いた以外は実施例 2 と同様な試験を行なった。結果を表 4～6 に示した。約 800 bp の増幅ゲノム DNA が検出され、33 品種のイネ (*Oryza sativa* L.) 植物を 2 タイプに識別することができた。

【0019】

【表 4】

品種番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
増幅ゲノム DNA 800bp	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
品種タイプ	A	B	A	A	A	A	B	A	A	A	A

【0020】

【表5】

品種番号	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
増幅ゲノム DNA 800bp	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
品種タイプ	A	A	A	A	B	A	A	B	A	A	A

【0021】

【表6】

品種番号	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
増幅ゲノム DNA 800bp	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
品種タイプ	A	A	A	A	A	A	A	B	B	A	B

* + : 増幅ゲノムDNAが検出された。

- : 増幅ゲノムDNAを検出できなかった。

【0022】実施例4 (ポリメラーゼチェイン反応の条件変化による品種の識別方法)

品種番号20および品種番号34のイネ (*Oryza sativa* L.) 品種の緑葉組織からゲノムDNAを実施例1に準じて抽出し、配列番号1および配列番号2で示される

配列からなる本発明オリゴヌクレオチドを用いて、実施例2に準じて増幅ゲノムDNAを検出した。この際に、ポリメラーゼチェイン反応におけるプライマーのアニーリング工程の温度条件を40°Cおよび50°Cとした。結果を表7に示す。

【0023】

【表7】

温度条件	増幅ゲノムDNA	供試品種	
		品種番号20	品種番号34
40°C	1070bp	+	+
	980bp	-	+
	600bp	+	+
50°C	1070bp	-	-
	980bp	-	-
	600bp	+	+

【0024】50°Cの温度条件では、約980bpの増幅ゲノムDNAが両供試品種とも検出されなかった。一方、40°Cの温度条件では、該増幅ゲノムDNAが品種番号34のイネ (*Oryza sativa* L.) 品種では検出されたが、品種番号20のイネ (*Oryza sativa* L.) 品種では検出されなかった。この差異により品種を識別できた。

【0025】実施例5 (各種のオリゴヌクレオチドを用いる品種の識別方法)

品種番号1 (黄金晴)、品種番号7 (トヨハタモチ)、品種番号15 (Lido)、品種番号22 (紅陽矮) お

よび品種番号30 (L201) のイネ (*Oryza sativa* L.) 品種の種子からゲノムDNAを実施例1に準じて抽出し、配列番号1ならび配列番号2および配列番号3ならび配列番号4で示される配列からなるオリゴヌクレオチドを別々に用いて、前記の実施例に準じて増幅ゲノムDNAを検出する。検出される増幅ゲノムDNAに基づき各種の本発明オリゴヌクレオチドにおける品種タイプを区別し、さらに該品種タイプから各種品種を識別する。結果、表8に示すように5種類すべての品種を識別できる。

【0026】

【表8】

品種番号	1	7	15	22	30
(1) 配列番号1および2で示される 配列からなるオリゴヌクレオチド					
増幅ゲノムDNA 1070bp	+	+	-	+	+
増幅ゲノムDNA 980bp	-	-	-	+	+
品種タイプ	B	B	D	A	A
(2) 配列番号3および4で示される 配列からなるオリゴヌクレオチド					
増幅ゲノムDNA 800bp	+	-	+	+	-
品種タイプ	A	B	A	A	B
品種の識別タイプ	a	b	c	d	e

* + : 増幅ゲノムDNAが検出された。

- : 増幅ゲノムDNAを検出できなかった。

【0027】実施例6 (各種のオリゴヌクレオチドを用いる品種の識別方法)

品種番号3(コシヒカリ)、品種番号2(アケノホシ)、品種番号12(雲糸21号)、品種番号23(密陽23号)および品種番号28(Chinsurah Boro II)のイネ(*Oryza sativa* L.)品種の種子からゲノムDNAを実施例1に準じて抽出し、配列番号1ならびに配列番号2および配列番号3ならびに配列番号4で示される配列からなるオリゴヌクレオチドを別々に用いて、実施例2および3に準じて増幅ゲノムDNAを検出する。検出される増幅ゲノムDNAに基づき各種の本発明オリゴヌクレオチドにおける品種タイプを区別し、さらに該品種タイプから各種品種を識別する。結果、表9に示すように5種類すべての品種を識別できる。

【0028】

【表9】

品種番号	3	2	12	23	28
(1) 配列番号1および2で示される 配列からなるオリゴヌクレオチド					
増幅ゲノムDNA 1070bp	+	+	-	+	-
増幅ゲノムDNA 980bp	-	-	-	+	+
品種タイプ	B	B	D	A	C
(2) 配列番号3および4で示される 配列からなるオリゴヌクレオチド					
増幅ゲノムDNA 800bp	+	-	+	+	+
品種タイプ	A	B	A	A	A
品種の識別タイプ	a	b	c	d	d

* + : 増幅ゲノムDNAが検出された。

- : 増幅ゲノムDNAを検出できなかった。

【0029】実施例6 (品種の純度検査)

種子生産のために栽培された品種番号28のイネ(*Oryza sativa* L.)植物から種子を得る。該種子50粒を育苗培土をつめたポットに1粒ずつ播種して温室内で栽培する。健全に生育した幼植物20個体から各々のゲノムDNAを実施例1に準じて抽出し、配列番号1および配列番号2で示される配列からなるオリゴヌクレオチドを用いて、実施例2に準じて増幅ゲノムDNAを検出する。検出される増幅ゲノムDNAと品種番号28のイネ(*Oryza sativa* L.)品種が本来所有する増幅ゲノムDNA(約980bp)および所有しない増幅ゲノムDNA(約1070bp)との差異を調べる。結果、品種番号28のイネ(*Oryza sativa* L.)品種が本来所有する増幅ゲノムDNA(約980bp)および所有しない増幅ゲノムDNA(約1070bp)と異なる増幅ゲノムDNAが検出された供試種子は不純物であり、この数より純度を算出することができる。なお、純度検査の精度を高めるには複数の本発明オリゴヌクレオチドを併用することにより可能である。

【0030】実施例7 (保存中における変異株のチェック)

遺伝種子資源として保存された品種番号28のイネ(*Oryza sativa* L.)品種の種子50粒から各々のゲノムDNAを実施例1に準じて抽出し、配列番号1および2で示される配列からなる本発明オリゴヌクレオチドを用いて、実施例2に準じて増幅ゲノムDNAを検出する。検出される増幅ゲノムDNAと品種番号28のイネ(*Oryza sativa* L.)品種が本来所有する増幅ゲノムDNA(約980bp)および所有しない増幅ゲノムDNA(約1070bp)との差異を調べる。結果、品種番号28のイネ(*Oryza sativa* L.)品種が本来所有する増幅ゲノムDNA(約980bp)および所有しない増幅ゲノムDNA

(約1070bp) と異なる増幅ゲノムDNAが検出された供試種子は変異株であり、この数より変異率を算出することができる。なお、変異率の精度を高めるには複数の本発明オリゴヌクレオチドを併用することにより可能である。

【0031】実施例8 (係争裁判での利用)

登録品種の種子20粒を育苗培土をつめたポットに1粒ずつ播種して温室内で栽培する。健全に生育した幼植物10個体からゲノムDNAを実施例1に準じて抽出し、配列番号1ならび配列番号2および配列番号3ならび4からなるオリゴヌクレオチドを別々に用いて、実施例2および3に準じて増幅ゲノムDNAを検出する。次に実施例5に準じて検出される増幅ゲノムDNAに基づき各々のオリゴヌクレオチドにおける品種タイプを区別し、さらに該品種タイプから登録品種の識別タイプを決定する。イ号品種の種子10粒を育苗培土をつめたポットに1粒ずつ播種して温室内で栽培する。健全に生育した幼植物5個体からゲノムDNAを実施例1に準じて抽出し、配列番号1ならび配列番号2および配列番号3ならび4からなるオリゴヌクレオチドを別々に用いて、実施例2および3に準じて増幅ゲノムDNAを検出する。次に実施例5に準じて検出される増幅ゲノムDNAに基づき各々のオリゴヌクレオチドにおける品種タイプを区別し、さらに該品種タイプから品種の識別タイプを調べる。結果、登録品種の識別タイプとイ号品種の識別タイプの比較により、同一品種であるか推定する証拠を迅速に、精度よく、かつ環境等で変化せずに得ることができる。なお、同定の精度をさらに高めるにはポリメラーゼチェイン反応の条件を変化させて同一な挙動を示すか否かを調べることにより可能である。

【0032】実施例9 (親子鑑定での利用: F1植物検定)

品種番号2のイネ (*Oryza sativa* L.) 品種を母親とし、品種番号15のイネ (*Oryza sativa* L.) 品種を父親として得られた植物の種子50粒から各々のゲノムDNAを実施例1に準じて抽出し、配列番号1ならび配列番号2および配列番号3ならび4からなるオリゴヌクレオチドを別々に用いて、実施例2に準じて増幅ゲノムDNAを検出する。検出される増幅ゲノムDNAと品種番号2のイネ (*Oryza sativa* L.) 品種が本来所有する増幅ゲノムDNA (約1070bp) ならび所有しない増幅ゲノムDNA (約980bp, 約800bp) および品種番号15のイネ (*Oryza sativa* L.) 品種が本来所有する増幅ゲノムDNA (約800bp) ならび所有しない増幅ゲノ

ムDNA (約1070bp, 約980bp) との差異を調べる。結果、母親および父親由来の約1070bp, 約980bp, 約800bpの増幅ゲノムDNAを所有する供試植物が識別され、F1植物であることを迅速に判定できる。

【0033】

【発明の効果】本発明方法は、本発明に用いるオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて、ポリメラーゼチエイン反応を利用することにより、イネ (*Oryza sativa* L.) 品種をより簡便にかつ効率よく識別する効果を有する。

【配列表】

【0034】配列番号: 1

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列

GGAGACATCATCGAACAGA 20

【0035】配列番号: 2

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列

TCCCTTCCAGGGCTCAAGTC 20

【0036】配列番号: 3

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列

TGGTAGCTTGTATTGGAG 20

【0037】配列番号: 4

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列

TCTAACATTTAGATGCAAG 20